

# Laboratorio di Preparazioni Estrattive

Estrattiva

**Estrazione del licopene dal concentrato di pomodoro**



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

## **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

**In questa esperienza si effettuerà una separazione, con una cromatografia di adsorbimento su colonna, di pigmenti (clorofille, caroteni) da un estratto acetonicco di foglie di spinaci. L'accuratezza della separazione ottenuta sarà verificata con una cromatografia di adsorbimento in strato sottile (TLC).**

## **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

**Per facilitare il processo di estrazione si triturano gli spinaci seccati in un mortaio con pestello e si esegue l'estrazione con acetone (solvente organico polare). I composti interessati all'estrazione saranno quelli facilmente solubili in solventi polari, cioè composti polari che ovviamente non saranno soltanto i pigmenti di nostro interesse.**

**L'estratto acetónico deve essere ulteriormente purificato attraverso una cromatografia di adsorbimento su colonna di gel di silice (  $\text{SiO}_2$  ).**

## **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

**La colonna presenta una fase solida polare (gel di silice) e tratterrà maggiormente, durante l'eluizione con acetato di etile/esano, i composti più polari. Le molecole del campione polari vengono adsorbite dal gruppo ossidrilico presente sulla superficie del riempimento.**

**La fase mobile polare fluisce continuamente nella colonna indebolendo il legame tra il campione ed il riempimento fino alla sua rottura.**

## **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

**Questo tipo di processo continua fino alla fine della colonna permettendo la separazione dei vari pigmenti in base alla forza dei legami che si instaurano con la fase stazionaria.**

**L'ordine di eluizione sarà  $\beta$ -carotene, poi le clorofille, ed infine la luteina.**

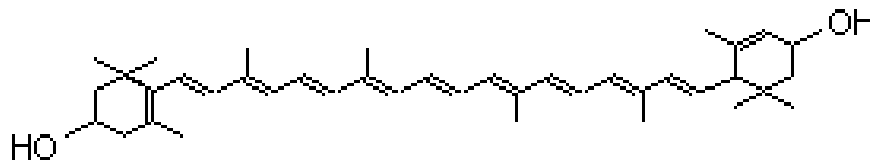
# Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci



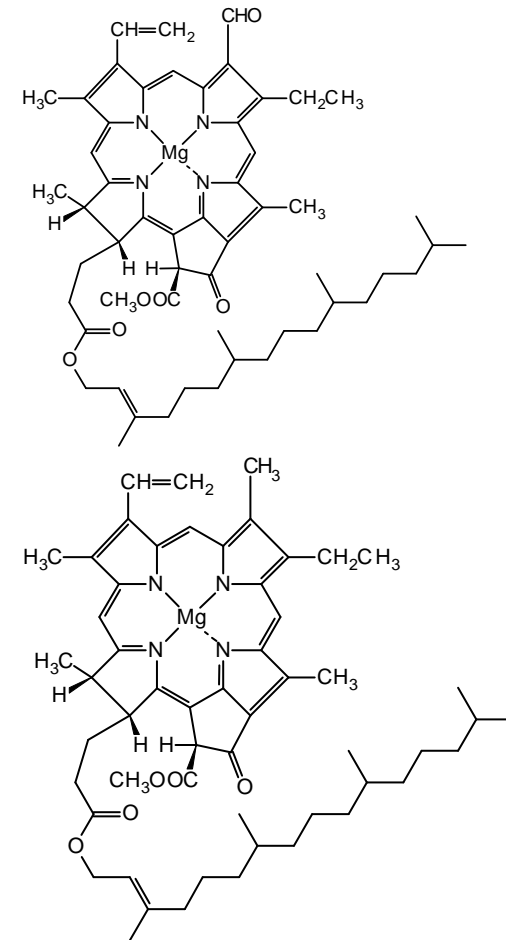
**Alfa-carotene**



**Beta-carotene**



**Luteina**



**Clorofille**

## **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

**Le frazioni ottenute dalla colonna cromatografica vengono controllate con una cromatografia in strato sottile (TLC) usando lastre di silice. Ogni macchia, quindi il corrispondente composto, può essere caratterizzata da un valore di R<sub>f</sub> (rapporto dei fronti)**

$$R_f = \frac{\text{distanza della macchia dal punto di partenza (cm)}}{\text{distanza del fronte del solvente dal punto di partenza (cm)}}$$

**Anche in questo caso si tratta di una cromatografia di adsorbimento ciò implica che le molecole più polari verranno eluite meno e quindi presenteranno un valore di R<sub>f</sub> inferiore a quello di composti meno polari.**

# **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

## **TRE FASI**

**A. Estrazione dei pigmenti**

**B. Separazione per cromatografia su colonna**

**C. Analisi per cromatografia su strato sottile (TLC)**



# **Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci**

## **Materiale Occorrente**

- A. Pallone a fondo tondo da 250 ml**
- B. Becker da 400 ml**
- C. Sostegno in metallo con snodi e pinze ad aggraffio**
- D. Colonna per cromatografia a cielo aperto (diametro circa 2 cm)**
- E. Beute da 250 ml**
- F. Provette e portaprovette**
- G. Agitatore magnetico e magnetino**
- H. Bacchetta di vetro e spatola**
- I. Pipette pasteur e tettarella**
- J. Imbuto e carta da filtro**
- K. Acetato di Etile**
- L. Acetone**
- M. Esano**
- N.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$**
- O. Rotavapor**

## Estrazione e separazione di pigmenti da spinaci



## A. Estrazione dei pigmenti

***Triturare in becker alcune foglie (4 o 5) di spinaci freschi, aggiungere 50 ml di acetone e lasciare in agitazione vigorosa mediante agitatore magnetico.***



## A. Estrazione dei pigmenti

***Quindi si filtra su carta e si evapora il solvente sotto vuoto al Rotavapor.***





## A. Estrazione dei pigmenti

*Il residuo acquoso viene ripreso con 50 ml di acetato di etile, si separano le due fasi mediante imbuto separatore. La fase acquosa viene di nuovo estratta con altro AcOEt (50 ml). Le fasi organiche riunite sono essiccate con solfato di sodio anidro e dopo 10' si filtra ed il filtrato è privato del solvente mediante evaporazione sotto vuoto. Sul residuo ottenuto si effettua una TLC in Esano/AcOEt 1:1).*



## **B. Separazione per cromatografia su colonna**

**1) Preparazione della colonna**

**2) Caricamento**

**3) Eluizione**

**4) Frazionamento**

## B. Separazione per cromatografia su colonna

### 1) Preparazione della colonna

Porre sul fondo di una colonna da 50 ml (circa 2 cm di diametro) un batuffolo di lana di vetro (non porre niente se la colonna ha un setto poroso filtrante). Impaccare circa 20-25 cm di colonna con gel di silice. Per far questo mettere circa 50 g. di gel di silice in un becker contenente 100 ml di esano, omogeneizzare con una bacchetta di vetro e versare il tutto nella colonna con un imbuto mantenendo in agitazione la miscela  $\text{SiO}_2$ /Esano mentre si versa.



## B. Separazione per cromatografia su colonna

**Aprire il rubinetto e raccogliere l'esano che fuoriesce. Fare attenzione a non lasciare andare a secco la colonna (cioè comporta la formazione di cammini preferenziali con perdita di efficienza e risoluzione della colonna) rabboccare eventualmente con esano.**

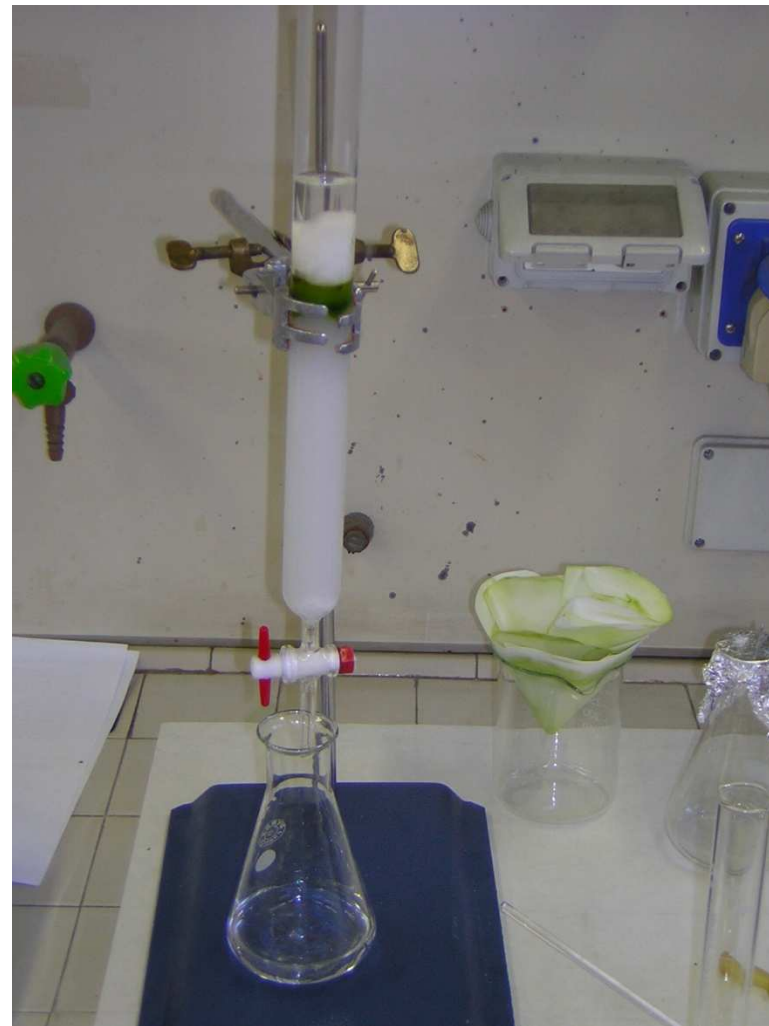




## B. Separazione per cromatografia su colonna

### 2) Caricamento

Portare il limite dell'esano a 1/2 mm dal gel di silice, porre un dischetto di carta sulla superficie della silice e, aiutandosi con una pipetta pasteur, versare nella colonna l'estratto risolto nella minima quantità di eluente (max 2 ml) (preservare alcune gocce, da utilizzare per l'analisi TLC) e lasciarlo adsorbire sulla silice. Aggiungere quindi un batuffolo di lana di vetro per evitare che durante l'aggiunta dell'eluente non si disturbi il letto della colonna



## **B. Separazione per cromatografia su colonna**

### **3) Eluizione**

**Si aggiungono quindi in successione**

- 40 ml di esano,**
- 80 ml di miscela esano-acetato di etile 3:1**
- 120 ml circa di miscela esano-acetato di etile 1:1**

**I pigmenti adsorbiti migreranno sulla colonna formando una serie di bande diversamente colorate.**

## B. Separazione per cromatografia su colonna

### 4) Frazionamento

Raccogliere separatamente le varie bande colorate in provette iniziando a frazionare (circa 5 ml a frazione) appena la prima banda gialla è prossima all'uscita.

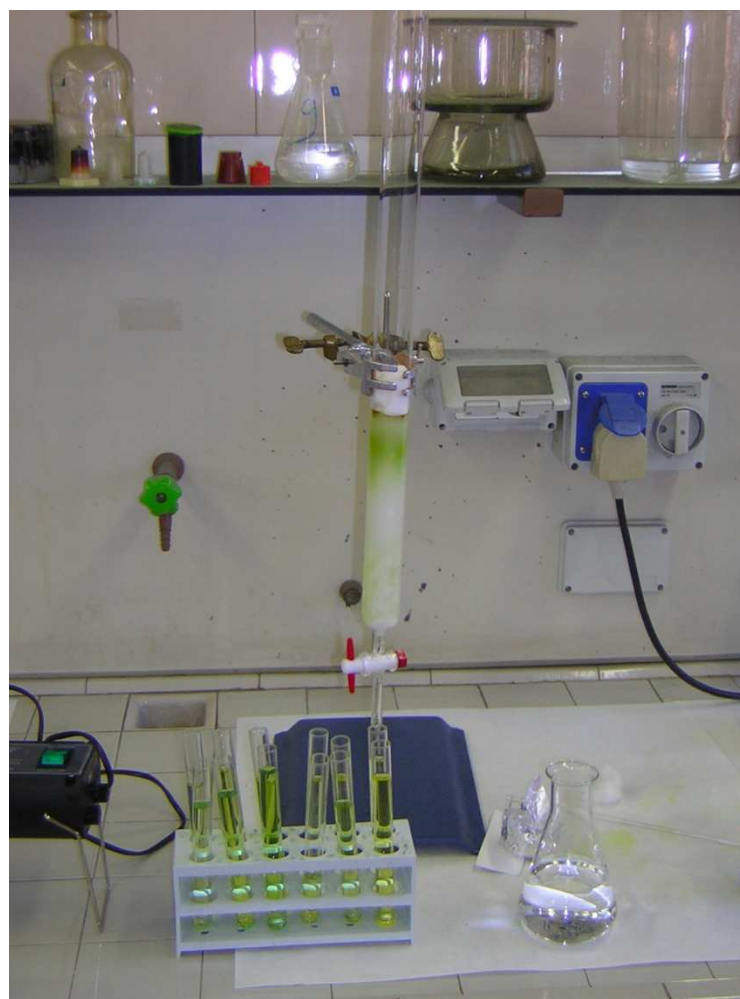
**Si dovrebbero ottenere almeno cinque frazioni:**

- a) caroteni:                      giallo scuri
- b) clorofille + caroteni
- c) clorofille:                    verdi
- d) luteina :                        gialla
- e) altri caroteni polari

Si riuniscono le frazioni che contengono lo stesso composto e si portano a secco in rotavapor separatamente.

## B. Separazione per cromatografia su colonna

### 4) Frazionamento



## **C. Analisi per cromatografia su strato sottile (TLC)**

**FS = silice**

**FM = miscela esano:acetato di etile 1:1**

**Sistema di rilevazione: UV-vis**

**Determinare per ogni macchia il valore di Rf.**